

---

# LA MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE DU SEQUOIA GÉANT EN VUE DU CLONAGE

O. MONTEUUIS

---

*Class. Oxford 174.7 Sequoiadendron giganteum (Lindl.) Buchholz : 165.4*

## SOMMAIRE

<b>1. introduction</b> .....	140
<b>2. matériel et modalités expérimentales</b> .....	141
21 - Matériel végétal d'étude .....	141
22 - Techniques expérimentales de multiplication végétative .....	142
23 - Conditions de culture .....	142
231 - in vivo .....	142
232 - in vitro .....	144
24 - Observations et mesures .....	144
241 - aptitude à la multiplication végétative .....	144
242 - examen d'autres marqueurs par référence au témoin juvénile .....	144
243 - expression des résultats .....	146
<b>3. bouturage</b> .....	147
31 - Différences individuelles .....	147
32 - Influence de l'âge .....	148
33 - Influence de l'origine topographique des boutures .....	148
34 - Effet saisonnier .....	149
35 - Comportement des boutures enracinées .....	150
351 - réponse caulogène .....	150
352 - réponse rhizogène .....	152
<b>4. greffage</b> .....	155
41 - Influence du type de greffe .....	155
42 - Influence du porte-greffe .....	156
421 - hauteur de greffage .....	156
422 - effet de la nutrition .....	157
423 - homogreffes et hétérogreffes .....	157
43 - Influence de l'origine du greffon .....	158
431 - différences interclonales .....	158
432 - origine topographique .....	159
44 - Comportement du matériel greffé .....	159
441 - caulogenèse .....	159
442 - rhizogenèse .....	159
<b>5. introduction in vitro</b> .....	163
51 - Les bourgeons .....	163
52 - Les microboutures .....	163
<b>6. conclusions</b> .....	165
Bibliographie .....	166
Résumé .....	168
Summary .....	168
Zusammenfassung .....	169
Annexes .....	170

## 1. introduction

*Sequoiadendron giganteum*, communément appelé sequoia géant, est un Gymnosperme de la famille des Taxodiacées intéressant à plus d'un titre (Destremau et al - 1980, Franclet - 1981) : vigueur et longévité remarquables, rythidome épais protecteur contre les incendies, bois imputrescible, de bonne qualité technologique, recherché par l'industrie papetière pour ses fibres longues. L'introduction du sequoia géant en Europe durant la seconde moitié du 19<sup>ème</sup> siècle, dans des stations très différentes, illustre l'amplitude écologique de l'espèce, dont l'aire d'origine se limite actuellement à une zone de 420 km de long dans la Sierra Nevada (USA).

Ces particularités ont incité l'AFOCEL à développer l'utilisation du *Sequoiadendron giganteum*. Appliquée à cette essence prometteuse, la multiplication végétative devrait favoriser la création de clones, voire de variétés polyclonales adaptées à partir d'ortets sélectionnés. Le succès d'une telle entreprise dépend de l'aptitude au clonage des sujets concernés, thème que nous avons abordé dans la présente étude.



## 2. matériel et modalités expérimentales

### 21 - MATÉRIEL VÉGÉTAL D'ÉTUDE

Nous nous sommes intéressés à trois catégories d'ortets, définis par leur âge : sujets juvéniles âgés de six à seize mois et faisant office de témoins, individus trentenaires et sujets centenaires. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 1.

TABLEAU N° 1  
*Matériel végétal étudié*

#### Sujets âgés de 6 à 16 mois

N° d'identification	Nature	Hauteur	Fructification	Localisation	Renseignements complémentaires
—	Semis	0,2 m	non	Pépinières Afocel de Marjevols - Lozère	1ère génération Bo prélevée sur des semis de 18 mois*
45115	Clone	0,15 m	non		

#### Sujets âgés d'une trentaine d'années

\* récolte Afocel en 1981 aux USA.

21	Tête de clone	9 m	début	Antrenas, alt. 900 m - Lozère -	
22		9 m	début		
23		18 m	oui		

#### Sujets centenaires

03	Tête de clone	34 m	oui	Arboretum de Puechagut alt. 1000 m, Gard	Branches fines, rameaux grêles foncés, taille des feuilles très réduite.
04		35 m	oui	idem	Pousses vigoureuses à l'aisselle d'une branche basse (04 R).
08		36 m	oui	Marvejols, Lozère	Branches basses élaguées en 1977; apparition en 1979 de pousses néoformées sur la section (08R).
15		33 m	oui	Cravant, Indre-et-Loire	Implanté sur substratum calcaire (pH 8,2).

Pour les besoins de l'étude, les trois individus trentenaires 21, 22 et 23, de port conique caractéristique des formes isolées, ont été divisés dans le sens de la hauteur en trois niveaux : zone basale « B », zone médiane « M », zone haute « H ». Les dissemblances morphologiques et l'architecture imposante des quatre sujets centenaires nous ont incités à différencier plusieurs secteurs localisés sur la figure 1 au sein de chaque arbre.

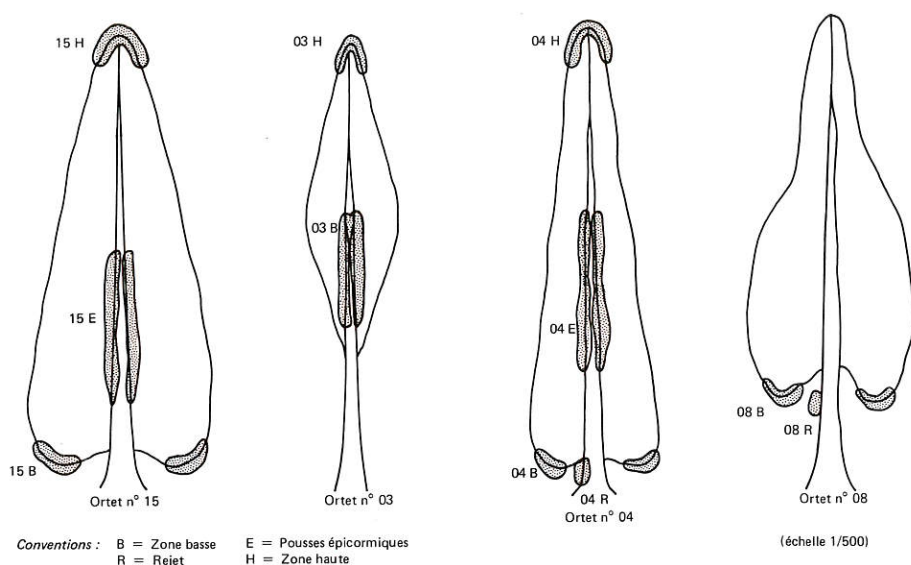


FIGURE N° 1  
*Zones topographiques de prélèvement des boutures*

## 22 - TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES DE MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE

Le clonage des arbres forestiers peut être réalisé par différentes techniques que nous avons résumées sur la figure 2, le bouturage étant l'outil le plus adapté à un matériel très réactif. Le cas échéant, le greffage et les possibilités offertes par la culture *in vitro* sont susceptibles de stimuler des potentialités morphogènes initiales relativement faibles (Boulay, 1980).

Dans le cadre de notre travail, nous nous intéresserons surtout aux problèmes posés par l'obtention des premières copies végétatives à partir de l'ortet *in situ* ou « mobilisation ».

## 23 - CONDITIONS DE CULTURE

### 231 - IN VIVO

Exceptée l'étude en rhizotron, les manipulations en conditions horticoles traditionnelles se sont déroulées dans la serre AFOCEL de la station de Marvejols, en Lozère.

#### 231.1 - Substrats

Tous les plants sont élevés en mottes « Melfert » (modèle 102). Le substrat de rhizogenèse est composé, en volume, de 1/3 de tourbe blonde, 1/3 de sable de rivière, 1/3 de perlite.



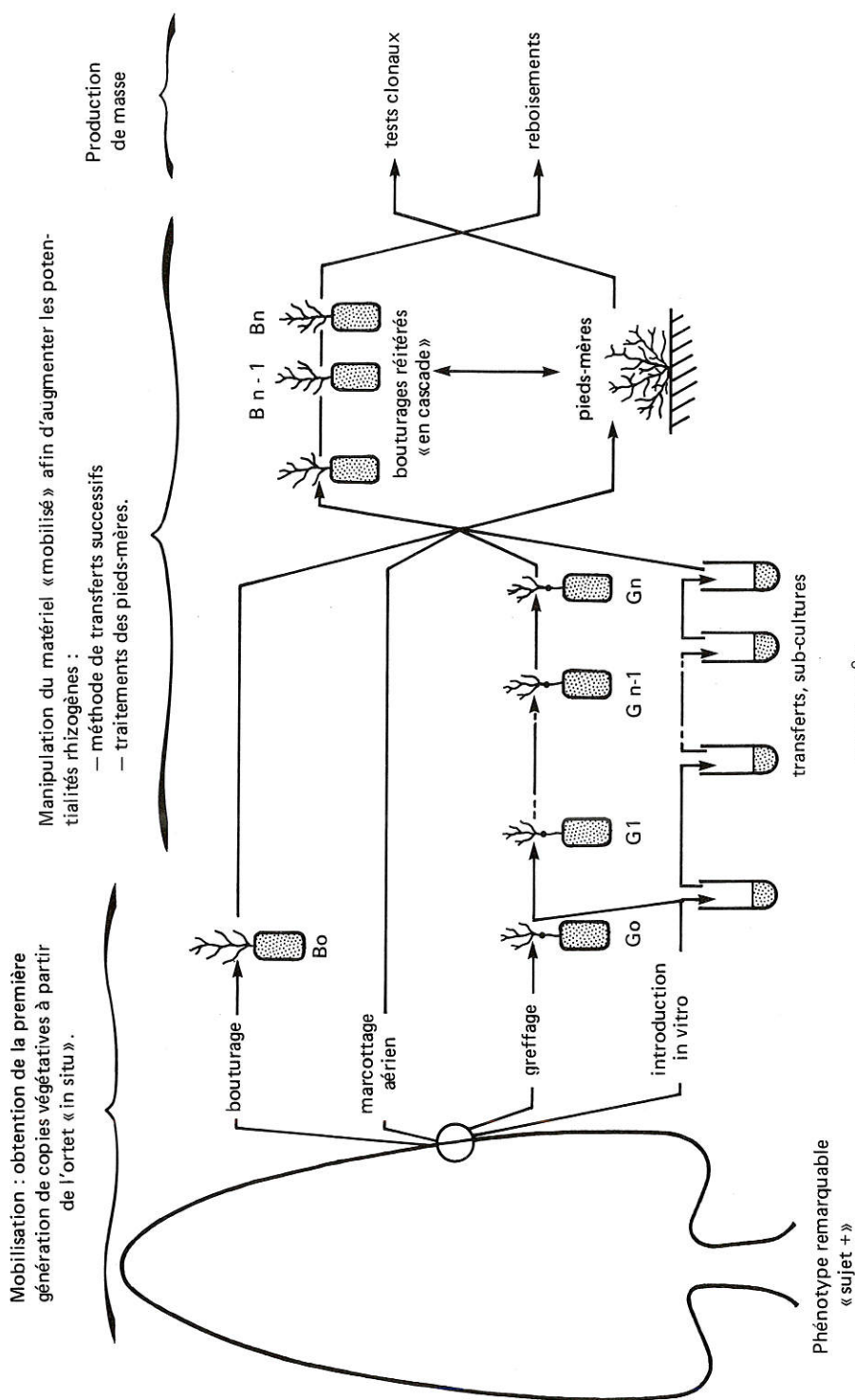


FIGURE N° 2  
Techniques de clonage applicables au *Sequoiadendron giganteum*

### 231.2 - Conditions ambiantes

L'enracinement des boutures s'effectue en atmosphère confinée saturée en humidité. L'hiver, la température ambiante dans les enceintes de bouturage est de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , et de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  pour le substrat. Le printemps et l'été, ces valeurs peuvent atteindre  $35^\circ$  à  $40^\circ\text{C}$ .

Les bacs de forçage sont équipés de tubes fluorescents «Sylvania Grolux» qui apportent de 19 h à 7 h un complément lumineux de  $4 \text{ W/m}^2$  au niveau des plantes.

L'étude en rhizotron a lieu en chambre climatique. Des tubes fluorescents couplés : «Sylvania Grolux» - «Mazda Fluor Blanc Ind.» fournissent de 6 h à 22 h une énergie lumineuse de  $17 \text{ W/m}^2$  (jours longs), pour une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  contre  $15 \pm 1^\circ\text{C}$  pour la phase obscure. La solution nutritive C1 indiquée en annexe II, ou diluée au quart C 0,25, est pulvérisée durant 1 minute toutes les 2 mn 30 s à l'intérieur du caisson.

### 232 - IN VITRO

La composition des milieux de culture est citée en annexe III. Le pH est ajusté à 5.5 par une solution de KOH 0,1 M. avant autoclavage à  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes. Le charbon actif est ajouté stérilement *après autoclavage* afin de réduire les risques d'hyperhydrie des explants, beaucoup plus importants lorsque le charbon actif est incorporé *avant* autoclavage (Monteuuis, 1984).

Des tubes fluorescents «Mazda Fluor : lumière du jour» assurent une intensité lumineuse de  $14 \text{ W/m}^2$  mesurée hors tube au niveau des cultures. La phase lumineuse est programmée de 4 h à 20 h (jours longs). La température est fixée à  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## 24 - OBSERVATIONS ET MESURES

Les fluctuations perturbatrices des conditions ambiantes ont justifié la présence d'un témoin juvénile noté T.

### 241 - APTITUDE A LA MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE

La réactivité au bouturage est exprimée en pourcentage de boutures enracinées au bout de trois mois, par rapport à l'effectif installé N. La réactivité, ou la réussite au greffage, notée R, est définie par le nombre de greffons vivants s'étant allongés au terme de la période d'observation, par opposition aux greffons non réactifs, NR.

### 242 - EXAMEN D'AUTRES MARQUEURS PAR RÉFÉRENCE AU TÉMOIN JUVÉNILO

L'aptitude à la multiplication végétative peut être corrélée, par analogie avec le matériel juvénile, à certains indices :

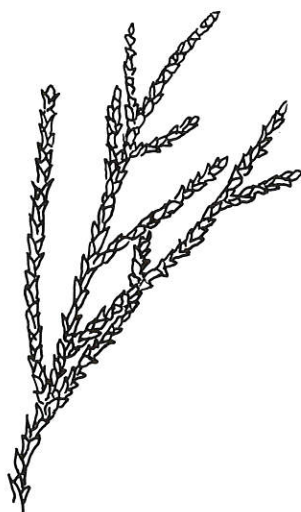
- caractéristiques phylломorphologiques

: la longueur moyenne notée x, de la partie libre des feuilles en alène des

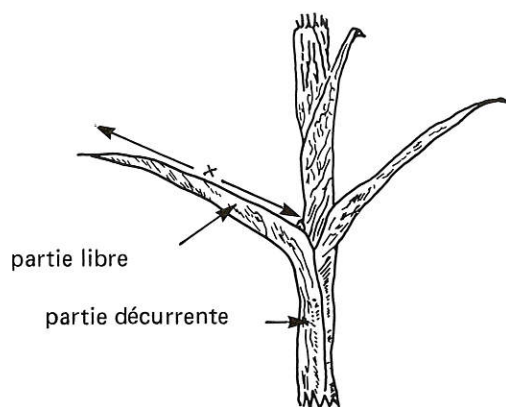
FIGURE N° 3  
*Morphologie foliaire*



a) sujet juvénile (x 1)  
(6 à 12 mois)



b) sujet âgé (x 1)



c) détail d'une feuille en alène (x 2,5)  
x : distance mesurée en mm.

ramets (fig. 3), mesurée en mm, est exprimée en chiffres romains entre parenthèses sur les histogrammes (fig. 4 et 5, 7b, 13).

- croissance

: la croissance moyenne des échantillons réactifs est appréciée par des relevés hebdomadaires, ou par l'accroissement total entre le début et la fin de la manipulation.

- tests « in vitro »

: la réactivité des explants est exprimée sur deux milieux différents, M1 et M2, cités en annexe III.

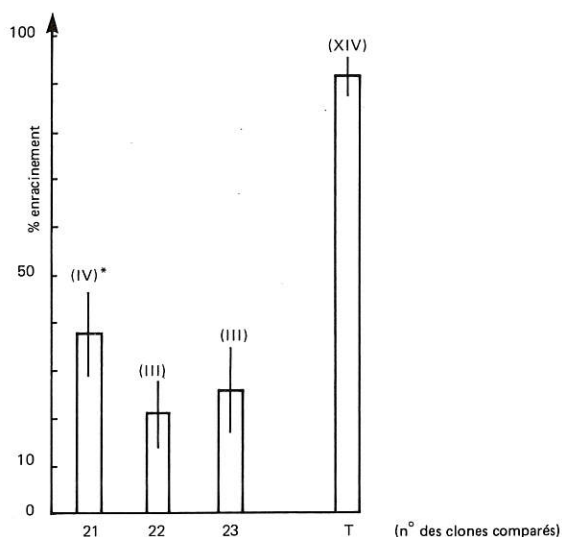


FIGURE N° 4

*Comparaisons trentenaires-juvéniles (T)*

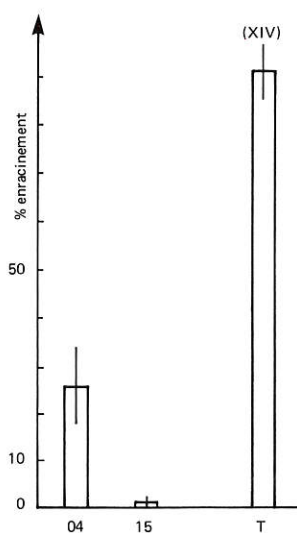


FIGURE N° 5

*Comparaisons centenaires-juvéniles (T)*

\* longueur moyenne de la partie libre des feuilles des ramets étudiés (§ 242 et figure 3).

## 243 - EXPRESSION DES RÉSULTATS

L'effectif observé par variante de traitement est précisé. Le seuil de signification a été fixé à 5 % pour l'ensemble des tests statistiques appliqués.



### 3. bouturage

Nous avons effectué quatre prélèvements sur les sujets trentenaires, représentés individuellement, pour chaque niveau, par vingt boutures en décembre 1982 et février 1983, et trente boutures en mai et décembre 1983. En ce qui concerne les centenaires, l'effectif total est de 100 boutures par origine topographique, prélevées pour la moitié en novembre 1983, le reste en avril 1984.

Le matériel végétal prélevé sur les ortets est rapidement fractionné en boutures de 7 cm de long. Leur base est entaillée sur 1 cm environ (Hartmann et Kester, 1975), puis mise à tremper durant 24 heures dans une solution à 2 % d'« Exubérone L », 0,4 % d'AIB par litre. Les boutures sont alors disposées par blocs de 10 unités dans des barquettes garnies de substrat de bouturage, puis placées en ambiance de rhizogenèse; l'ensemble est randomisé. La mesure des essais a eu lieu au bout de trois mois.

#### 31 - DIFFÉRENCES INDIVIDUELLES

Nous avons comparé l'aptitude à la néoformation racinaire d'individus de même âge :

##### - *individus trentenaires*

L'étude est réalisée sur les individus 21, 22, 23 à partir d'un effectif total de 100 boutures par ortet, prélevées sur quatre périodes, sur la zone basse des arbres. Dans ces conditions, un  $\chi^2$  de 9,57 indique que le facteur testé est significatif au seuil  $\alpha = 0,01$  : il existe une différence quant à l'aptitude individuelle à la rhizogenèse, notamment entre les sujets 21 et 22 (fig. 4).

##### - *individus centenaires*

Une analyse de variance des résultats obtenus pour les sujets 03, 04, 08 et 15, en considérant les enracinements de l'ensemble des boutures prélevées sur chacun d'eux toutes zones confondues, révèle des différences significatives au seuil  $\alpha = 0,025 - F_{18}^3 = 4,579$ .

ortet 04 : 17,8 % (N = 400)

ortet 15 : 0,67 % (N = 300)

ortet 03 : 1,6 % (N = 200)

ortet 08 : 0,5 % (N = 200)

L'origine topographique, en fonction du type architectural considéré, peut avoir une influence sur l'enracinement des boutures. L'analyse des différences individuelles à partir de références similaires paraît plus légitime.

Ainsi, une étude comparative, réalisée sur les arbres 04 et 15 à partir d'un effectif total N de 300 boutures par individu rassemblant les mêmes zones basses, épïcormiques et hautes, pour les deux arbres, montre encore une différence très nette toujours au profit de l'individu 04 (12 % contre 0,67 %) (fig. 5).

L'application au sequoia géant des techniques d'annélations corticales ou de marcottage aérien, inspirées des travaux de Hare (Hare, 1977, voir annexe I), est peu convaincante : à partir de 10 marcottes aériennes et 30 annélations corticales pratiquées en juin 1983 sur le matériel suivant : 03H, 04B, 15B (voir fig. 1), nous avons obtenu la formation de « quatre bourrelets rhizomorphes » et l'enracinement d'une marcotte, uniquement sur 04, ce qui confirme les prédispositions de cet individu quant à la régénération végétative.

### 32 - INFLUENCE DE L'ÂGE

Les figures 4 et 5 — zone basse, N = 100 — permettent de comparer des sujets âgés d'une trentaine et d'une centaine d'années à des témoins juvéniles beaucoup moins développés. On constate une diminution des facultés d'enracinement des sujets âgés, caractérisés, en outre, par une morphologie foliaire plus réduite (§ 242).

Une comparaison individuelle interclasse est possible en rapportant les taux d'enracinement des individus âgés à leurs témoins respectifs. Les pourcentages relatifs obtenus sont visualisés sur la figure 6 : on constate que malgré les années de différence, un individu centenaire, en l'occurrence 04, peut manifester des capacités rhizogènes comparables à des sujets trentenaires.

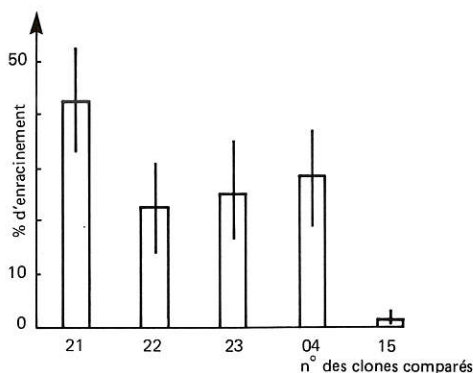


FIGURE N° 6  
*Comparaison trentenaires-centenaires*

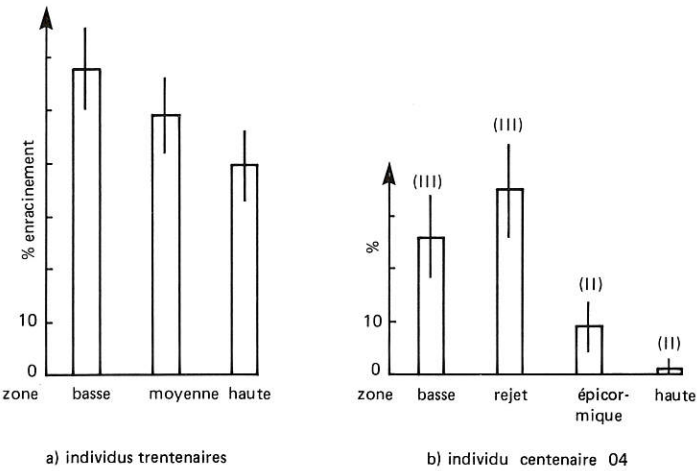
### 33 - INFLUENCE DE L'ORIGINE TOPOGRAPHIQUE DES BOUTURES

Les résultats relatifs à la zonation des individus trentenaires sont visualisés figure 7a. L'histogramme a été réalisé à partir d'échantillons de 160

ramets regroupant les bouturages de décembre, mai et septembre sur les sujets 21 et 22. Les boutures du tiers inférieur des ortets s'enracinent mieux que le matériel prélevé dans la partie supérieure; le test  $\chi^2$  confirme cette différence significative à 3 %.

L'influence de la situation topographique des boutures sur leur enracinement a également été analysée sur les centenaires. Les résultats obtenus indiquent un effet positif de la proximité de l'appareil racinaire sur l'enracinement des boutures : les zones basses, rejets, pousses épïcormiques s'enracinent préférentiellement aux boutures récoltées dans la cime de l'arbre. L'exemple de 04, rapporté fig. 7b, est démonstratif ( $\chi^2 = 17,56$ ; 3 d.d.l.).

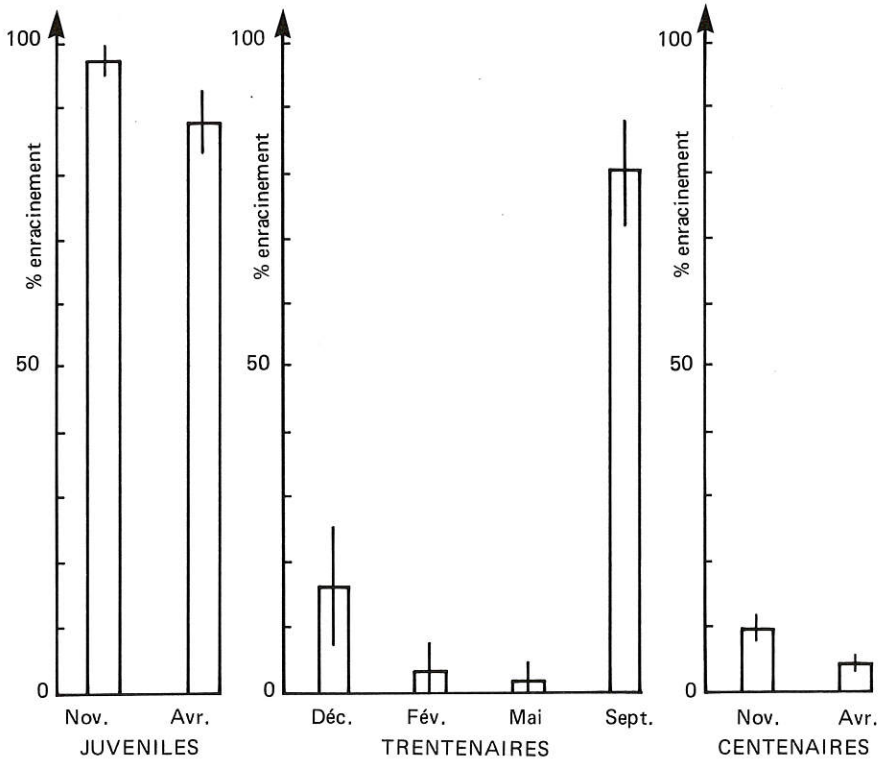
FIGURE N° 7  
Influence de l'origine topographique des boutures sur l'enracinement



### 34 - EFFET SAISONNIER

Les prélèvements échelonnés sur l'année ont permis de mettre en évidence, sur le matériel étudié, un effet saisonnier sur l'enracinement des boutures. Ainsi, les sujets juvéniles et centenaires, dans les conditions de bouturage de Marvejols, s'enracinent moins bien en avril qu'en novembre. En ce qui concerne les trentenaires, les variations saisonnières sont particulièrement nettes, surtout au profit de septembre (fig. 8 :  $F^2_3 = 52,4$ ). Ces différences traduisent certainement des changements endogènes à l'aptitude à la rhizogenèse. Une analyse plus rigoureuse du phénomène suppose une étude en conditions d'ambiance rhizogène constantes.

FIGURE N° 8  
Effet saisonnier sur l'enracinement des boutures



### 35 - COMPORTEMENT DES BOUTURES ENRACINÉES

Nous avons observé les facultés organogènes de la première génération Bo de boutures des clones 21 et 04 enracinées et repiquées en mottes « Melfert ».

#### 351 - RÉPONSE CAULOGENE

Au printemps, la reprise d'activité au sein d'un même clone est plus ou moins étalée dans le temps, en fonction des individus. Dans certains cas, l'inertie caulinaire est totale, malgré un appareil racinaire bien développé. Les nouvelles pousses émises présentent un développement foliaire différent de l'axe sous-jacent : les feuilles plus longues, s'apparentent dans une certaine mesure au type morphologique juvénile. Le phénomène se manifeste de façon plus ou moins intense et brutale : sur certains rameaux, une courte zone transitoire, constituée d'appendices foliaires mal définis, reflète les perturbations organogènes vraisemblables au sein du méristème sollicité. Au fur et à mesure de la croissance et des ramifications de la nouvelle pousse, on constate dans certains cas une diminution progressive de la taille des feuilles.





Modifications progressives de la morphologie foliaire. Activité caulogène variable et dimorphisme foliaire.

#### CLONE 21 : BOUTURE Bo

Contrairement au bouturage d'individus juvéniles, l'instauration naturelle d'un régime de préséance entre bourgeons et d'un mode de croissance orthotrope est aléatoire dès la première génération de boutures issues de matériel âgé. Il semble qu'il y ait une altération plus ou moins marquée du pouvoir de réacquisition du processus de développement des tiges en fonction de l'âge.

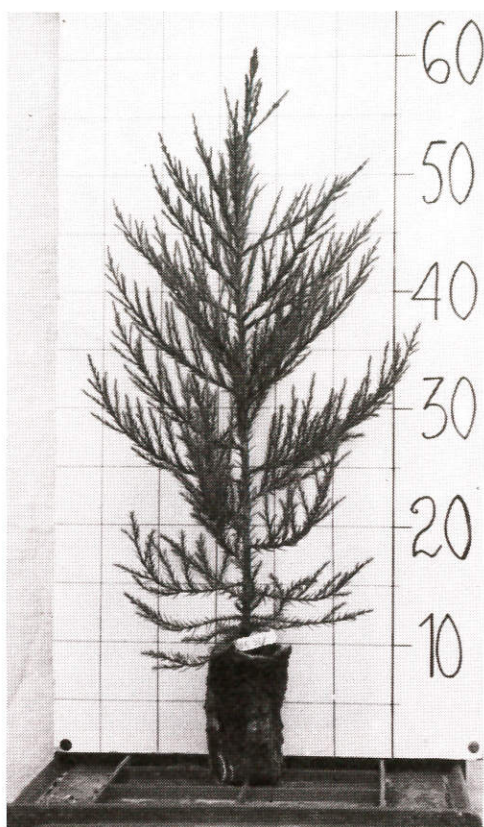
Le recours aux techniques de taille peut être une solution à cet handicap. Un essai dans ce sens porte sur les boutures Bo du clone 21. L'effectif est de 10 boutures pour chacune des trois variantes suivantes du traitement :

- A : seul le «vieux bois», ou pousses antérieures à la mobilisation, est conservé par une taille à 1 cm sous la base des nouvelles pousses;
- B : la base des nouvelles pousses est conservée (1 cm en moyenne) et la partie supérieure sectionnée;
- C : les boutures sont conservées dans leur intégralité.

Le traitement a été réalisé en novembre 1983; en mai, soit six mois plus tard, on observe :

- variante A : 5 morts, 5 totalement inertes;
- variante B : tous les individus ont régénéré de nouvelles pousses à partir de la portion de 1 cm préservée ;
- variante C : les témoins continuent leur croissance plagiotrope.

Seules les pousses émises après mobilisation réagissent favorablement à la taille. D'autres essais similaires abondent en ce sens et incitent à penser que l'émission de pousses axillaires consécutive à la taille dépend de l'âge, donc du degré de différenciation des axes sollicités.



Bouture Bo de cinq mois  
prélevée sur jeune semis.

### 352 - RÉPONSE RHIZOGENE

Nous avons testé l'influence de la mobilisation sur l'aptitude à l'enracinement en comparant le bouturage de ramets prélevés directement sur l'ortet, zone basse, et sur la génération Bo. L'observation porte sur le bouturage de novembre 1983 des clones 04 et 21. Dans les deux cas, on note un effet positif de la mobilisation sur le taux d'enracinement, notamment pour 04 (fig. 13a).

#### Commentaires

Ces divers résultats corroborent les renseignements bibliographiques et les observations que nous avons pu réaliser dans les pépinières AFOCEL de l'Étançon et de Marvejols.

- Les jeunes sujets présentent une bonne aptitude à la rhizogenèse (Fins, 1980, Platt, 1980) : le pourcentage d'enracinement dans des conditions ambiantes adéquates et en tenant compte de l'influence saisonnière oscille entre 80 et 95 %. Les premières phases de la régénération végétative (rhizogenèse) engendrent un développement ontogénique conforme, par référence au pied-mère juvénile d'origine : on peut parler de reproduction végétative au sens strict du terme.

• Comme le remarquent Libby et Wolford (1976), l'aptitude rhizogène décroît généralement avec l'âge des sujets d'origine, bien que les résultats enregistrés à partir de certains individus centenaires (arbre n° 4) soient encore fort acceptables. Mais, contrairement aux jeunes semis, la mobilisation d'ortets âgés s'accompagne généralement de la persistance du phénomène de topophysie préjudiciable au clonage et responsable d'une variabilité intraclonale plus ou moins marquée.

D'autre part, l'antagonisme entre la capacité à fructifier et l'aptitude à la rhizogenèse (Wareing, 1959, Chajlakayan et al. 1974, Hackett, 1980) est réfutable : les sujets âgés étudiés sont tous fructifères et les boutures de l'arbre n° 4 (B) ont été prélevées au voisinage des cônes. Il semble que les jugements d'ensemble à l'échelle du végétal considéré globalement doivent être nuancés dans le cas de systèmes architecturaux pérennes aussi développés que les sujets âgés étudiés. Ceux-ci pourraient être constitués par une juxtaposition de territoires ou zones physiologiquement différents apparemment influencés, du moins en ce qui concerne l'aptitude rhizo-

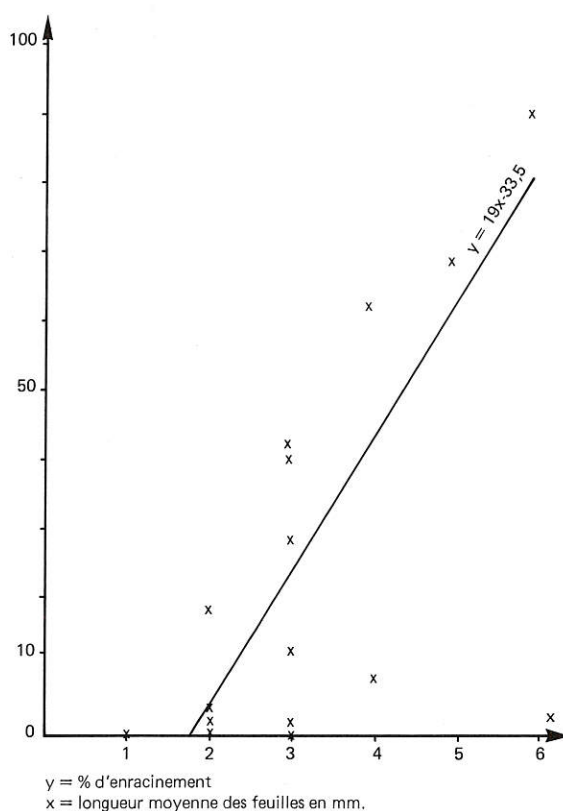


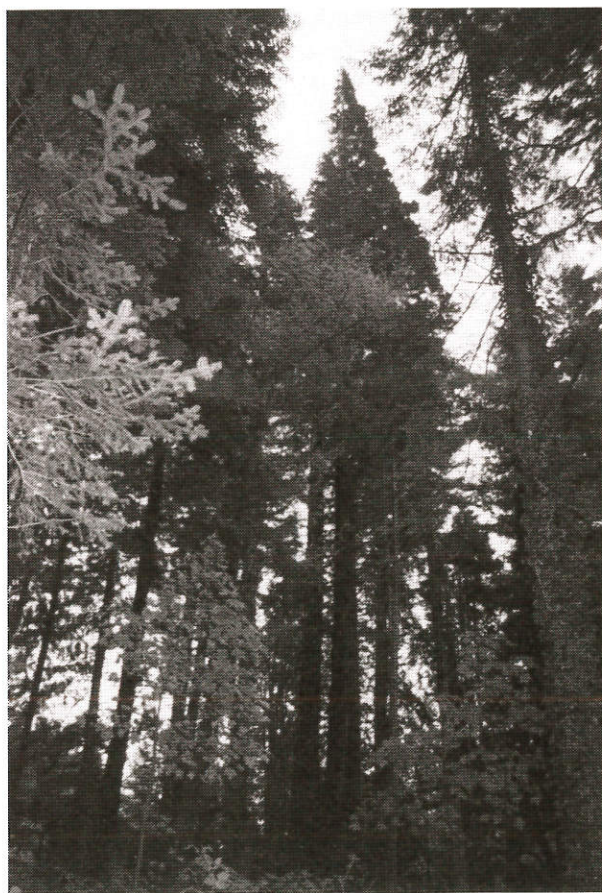
FIGURE N° 9

*L'aptitude à l'enracinement peut être corrélée à la morphologie foliaire des ramets sous la forme d'une droite de régression d'équation :  $y = 19x - 33,5$*



gène, par la proximité de l'appareil racinaire. Cette faculté d'enracinement est étroitement corrélée à la morphologie foliaire du matériel à bouturer : les 28 couples de données  $x, y$  ( $x$  : longueur moyenne en mm des feuilles;  $y$  : pourcentage d'enracinement) relevés permettent d'assimiler la fonction  $y = f(x)$  à une droite de régression d'équation  $y = 19x - 33,5$  (fig. 9; pour  $x > 6$ , le taux d'enracinement  $y$  varie de 80 à 100 %).

Cette corrélation ( $r = 0,88$ ) permet de choisir d'emblée, à partir de caractéristiques morphologiques immédiates (fig. 3) le matériel le plus réactif au sein de « l'individu plus » à cloner, et de faciliter ainsi sa mobilisation.



Individu 03.



## 4. greffage

Nous nous sommes inspirés des travaux de Doorenbos (1953, 1965), Franclet (1969) et de De la Gloubaye (1980) relatifs à la réactivation par greffage de matériel âgé. Sauf indications contraires, nous avons respecté les modalités suivantes : les greffons, de taille inférieure à 1 cm, sont greffés « en tête » à 5 cm du collet sur des semis de sequoia géant âgés de 6 à 12 mois et repiqués en mottes « Melfert ». Les greffes sont alors immédiatement placées en situation d'hygrométrie saturante durant trois semaines, puis disposées dans les bacs de forçage. Les notations commencent à cette date sur l'effectif observé de N individus par variante de traitement. L'étude porte essentiellement sur les sujets centenaires : 03, 04, 08 et 15; le clone juvénile 45 115 sert de témoin de référence noté T.

### 41 - INFLUENCE DU TYPE DE GREFFE

Traditionnellement, les pépiniéristes greffent les conifères « en placage » (Hartmann et Kester, 1975). Nous avons comparé cette méthode à la greffe « en tête » à partir d'un échantillon de 19 géotypes (individus centenaires) greffés en mars 1983 sur des semis âgés de 12 mois. Les greffons « en tête », d'une taille moyenne de 4 cm, sont greffés à une dizaine de centimètres du collet; les ramets, greffés « en placage » à 2 cm du collet, mesurent 7 cm.

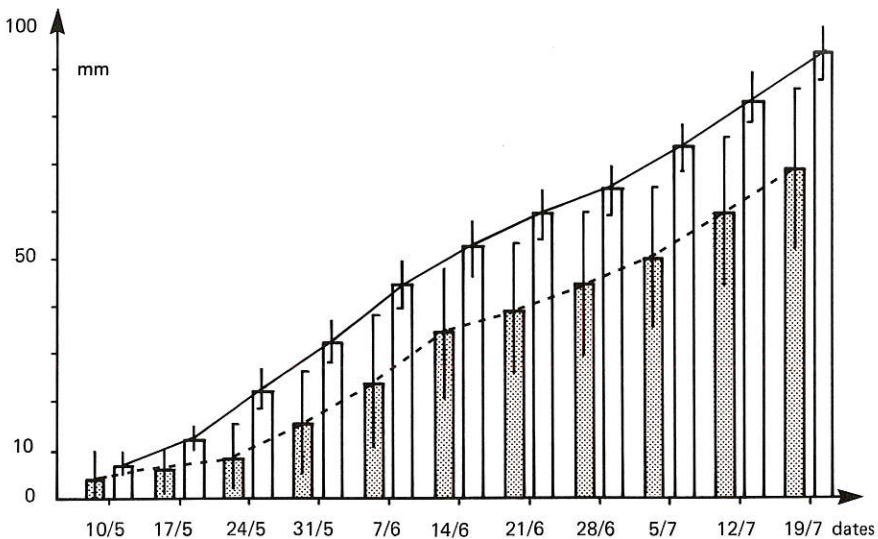


FIGURE N° 10

*Influence bénéfique des « greffes en tête »*

- par rapport aux « greffes en placage »
- ▨ sur l'allongement des greffons

L'inventaire effectué six mois plus tard à partir de 56 observations n'indique pas de différence significative concernant les taux de réussite entre «greffes en placage» (87 %) et «greffes en tête» (86 %).

Par contre, on constate que les «greffes en tête» favorisent l'allongement des greffons (fig. 10, N = 76) préférentiellement aux greffes «en placage» et ce, malgré l'éloignement de l'appareil racinaire, ce que confirme Blethon (1984).

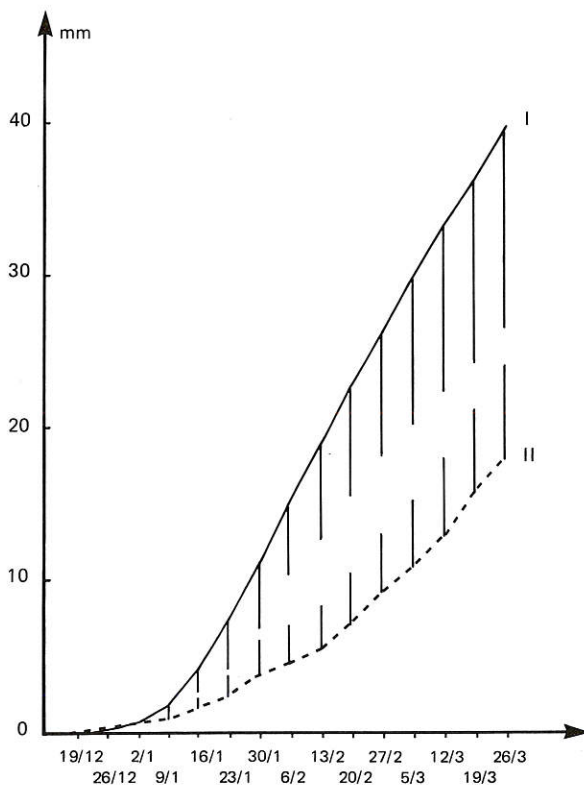
## 42 - INFLUENCE DU PORTE-GREFFE

### 421 - HAUTEUR DE GREFFAGE

L'influence du pôle racinaire a été analysé sur les clones âgés 03, 04, 15 et le clone juvénile 45115, greffés en novembre 1983 sur deux catégories de porte-greffes, à raison de 32 greffes par variante :

- I - les porte-greffes, âgés de 6 mois, ont une taille moyenne, en tige de 8 cm, et sont greffés à 5 cm du collet;
- II - les porte-greffes, âgés de 9 mois, ont une taille moyenne de 17 cm et sont greffés à 13 cm au-dessus du collet.

FIGURE N° 11  
*Allongement moyen des greffons en fonction de la hauteur de greffage  
(variantes I et II)*



Au terme de la manipulation, soit 5 mois plus tard, on ne distingue pas de différence notable des taux de réactivité : 59 % pour I et 53 % pour II. En revanche, il apparaît nettement sur le graphe de la figure 11 que la proximité de l'appareil racinaire (variante I) favorise la croissance en longueur des greffons.

#### 422 - EFFET DE LA NUTRITION

L'essai en rhizotron a été réalisé à partir de ramets prélevés sur 08R et greffés fin mars 1984 sur la deuxième génération de boutures du clone juvénile Afocel 183 63. Les porte-greffes, récemment enracinés, ont été installés début janvier 1984 en rhizotron. Les deux solutions nutritives C1 (annexe II) ou diluée au quart C0,25 sont utilisées.

L'acclimatation s'effectue sans problème; à la date du greffage, la différence de vigueur, au profit de la solution nutritive la plus concentrée, est à peine visible. Les greffes sont maintenues trois à quatre semaines sous confinement avant les premières mesures hebdomadaires qui s'achèveront mi-juillet.

Dans les conditions expérimentales définies, la concentration de la solution nutritive n'a pas d'effet notable sur la cinétique d'allongement des greffons, contrairement aux taux de reprise, significativement différents (tableau 2), au profit de la solution la plus concentrée C1.

TABLEAU N° 2  
*Effectifs de greffons réactifs R, ou non réactifs NR, en fonction de la concentration de la solution nutritive C1 et C 0,25*

concentrations réponses	C1	C 0,25	totaux
R . . . . .	23	15	38
NR . . . . .	13	21	34
Totaux . . . . .	36	36	72

#### 423 - HOMOGREFFES ET HÉTÉROGREFFES

L'influence de la nature du porte-greffe sur l'évolution du greffon peut être étudiée pour comparer :

- des porte-greffes de même espèce, mais d'origines différentes : semis et boutures clonées;
- des homogreffes à des hétérogreffes : certains horticulteurs greffent *Sequoiadendron giganteum*, cultivar "pendulum" plus spécialement sur *Sequoia sempervirens* (Franclet, 1981b).

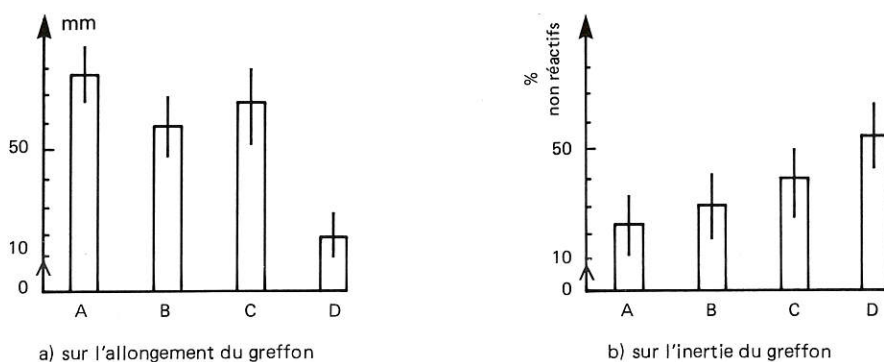
A cette fin, nous avons greffé en avril 1984 le matériel suivant : 03E, 04B, 15B et 45115 sur quatre origines de porte-greffes, notées A, B et C pour les *Sequoiadendron giganteum* et D pour le *Sequoia sempervirens*.

- A : plants issus de semis et âgés de 6 mois, taille moyenne 13 cm,  
 B : boutures de deuxième génération du clone juvénile Afocel 4856, âgées de 6 mois et de taille moyenne : 15 cm,  
 C : le clone Afocel 191160 se différencie du précédent par sa vigueur légèrement plus faible : taille moyenne 10 cm,  
 D : clone Afocel 250 : *Sequoia sempervirens*.

L'essai, de type factoriel, regroupe 16 combinaisons (4 x 4) représentées chacune initialement par 15 greffes. L'effectif par variante de traitement (clones greffés ou porte-greffes) est de 60 individus. Les accroissements totaux ont été établis sur une période de trois mois à dater du greffage, au terme desquels on a dénombré les greffons non réactifs.

On note un effet défavorable, confirmé par une analyse de variance, du clone 250 (*Sequoia sempervirens*) sur la vigueur (fig. 12a :  $N_A = 43$ ;  $N_B = 36$ ;  $N_C = 33$ ;  $N_D = 25$ ;  $\alpha < 0,001$ ) et sur l'inertie des greffons (fig. 12b :  $\alpha = 0,025$ ) par rapport aux trois lots d'homogreffes.

FIGURE N° 12  
*Influence du porte-greffe sur le devenir du greffon*



## 43 - INFLUENCE DE L'ORIGINE DU GREFFON

### 431 - DIFFÉRENCES INTERCLONALES

Nous retrouvons, après la première génération de greffes Go des clones 03, 04, 08, 15 et 45115 (T), les différences correspondant aux résultats du bouturage: les greffons de 04 sont plus vigoureux que ceux des clones 08, 15 et 03; l'ensemble demeure inférieur au clone juvénile 45115.

Les greffages, réitérés en cascade, selon la méthode de De la Goublaye (1980), n'ont pas donné les résultats escomptés au cours des générations successives G1, G2 et G3. L'analyse est perturbée, quelle que soit la génération considérée, par une grande variabilité intraclonale des greffons, et ce, pour chacun des clones, y compris le matériel juvénile (Monteuuis, 1984).



#### 432 - ORIGINE TOPOGRAPHIQUE

Se référant à la zonation de l'ortet quant à ses capacités rhizogènes, nous avons voulu vérifier l'influence de l'origine topographique des greffons sur leur devenir une fois greffés dans des conditions identiques.

L'étude réalisée avec 08B, 08R et 15B, 15H, à raison de 30 représentants par zone, greffés sur un clone homogène de jeunes porte-greffes ne permet pas d'établir de différences significatives sur l'inertie, ni sur la croissance des greffons en fonction de leur position originelle sur l'ortet.

#### 44 - COMPORTEMENT DU MATÉRIEL GREFFÉ

##### 441 - CAULOGÉNÈSE

Comme pour les boutures, la mobilisation du matériel âgé par greffage s'accompagne de modifications morphologiques : les nouvelles feuilles sont plus grandes. Le phénomène, d'autant plus accentué que le greffon d'origine est long et tarde à pousser, s'atténue avec la croissance et les ramifications. Les pousses issues de greffons plus petits — longueur (0,5 cm) et diamètre — sont plus tendres; les modifications foliaires décrites précédemment, moins contrastées, persistent avec l'allongement de l'axe. La topophyse se manifeste par la persistance plus ou moins forte d'un mode de croissance plagiotrope. La restitution naturelle de l'orthotropie par redressement progressif de l'extrémité du greffon, bourgeonnement au niveau des arcures, voire du bourrelet de greffe, est variable. La taille favorise l'émission de nouvelles pousses vigoureuses à partir du matériel régénéré après mobilisation.

##### 442 - RHIZOGÉNÈSE

Comme dans le cas du bouturage, la mobilisation de ramets par greffage stimule leur aptitude ultérieure à la rhizogénèse (fig. 13b, novembre 1983, N = 50).

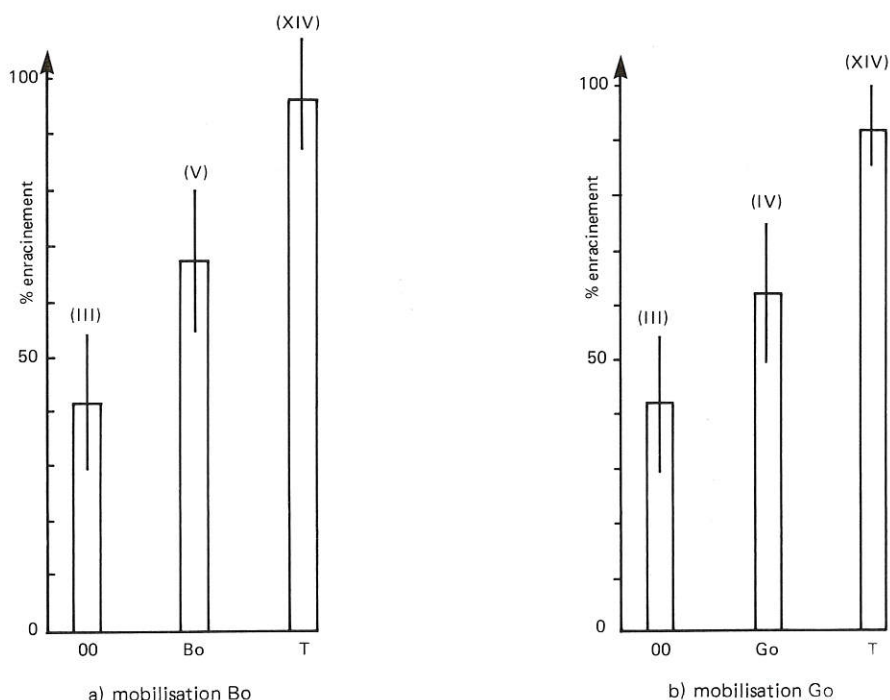
#### Commentaires

Le greffage a permis de confirmer l'influence bénéfique de la proximité de l'appareil racinaire sur la réacquisition de certains comportements morphogènes caractéristiques des formes de jeunesse : rhizogénèse, caulogénèse, phyllogénèse... Néanmoins, les résultats enregistrés au § 41 tendent à montrer que l'état de différenciation et de maturité des structures intermédiaires de transfert entre le pôle racinaire, pourvoyeur de métabolites et les méristèmes organogènes, est également à prendre en considération; les greffons âgés en placage sont plus longs que leurs homologues en tête. Ces différences histologiques en fonction de l'âge du matériel sont susceptibles d'expliquer divers types d'incompatibilités liées à l'âge



CLONE CENTENAIRE 03  
: dimorphisme foliaire dû à la greffe de mobilisation Go.

FIGURE N° 13  
*Effet de la mobilisation sur l'enracinement des boutures*  
*Clone 04. Les ramets notés 00 sont situés in situ dans la zone basse de l'ortet*



respectif du greffon et du porte-greffe au niveau de la zone de contact (Lachaud, 1975). L'aptitude à la dédifférenciation et, par suite, la qualité de l'union entre les deux partenaires s'en trouveraient défavorisées, ce qui aurait pour effet d'augmenter l'hétérogénéité des réponses, déjà passablement élevée dans le cas de greffons juvéniles.

Les diverses observations que nous avons pu effectuer tout au long de notre étude nous incitent à nous orienter vers la mise au point de techniques visant à miniaturiser à l'extrême les greffons. Le microgreffage, en conditions d'aseptie in vitro, peut être la solution. Enfin, pour terminer, il faut souligner la supériorité des homogreffes par rapport aux hétérogreffes en ce qui concerne la réactivation du matériel âgé. L'utilisation du *Sequoia sempervirens* en tant que porte-greffe peut se justifier en horticulture ornementale pour éviter les confusions entre greffon et porte-greffe, ou pour le maintien du port pleureur ornemental, mais ne saurait être retenue dans notre cas.



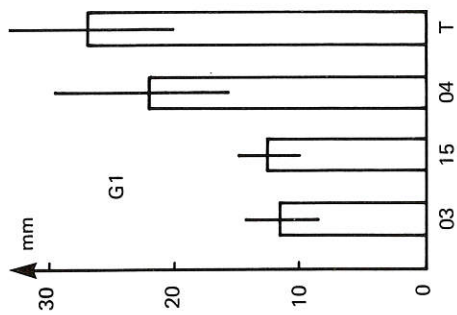
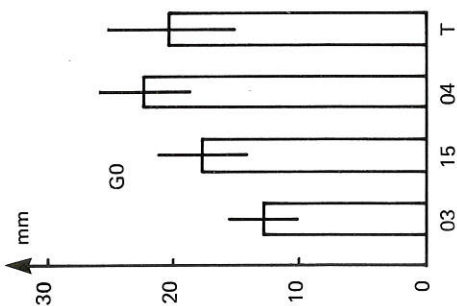
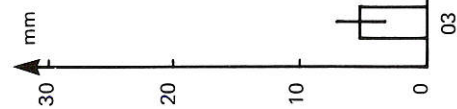


FIGURE N° 14 a

*Allongement moyen clonal des microboutures en fonction des générations 00, G0, G1.*

Génération 00

	03	15	04	T
R	8	8	10	5
NR	8	7	4	4
C+	2	3	4	9

C+ : contaminations.

Génération G0

	03	15	04	T
R	15	16	11	14
NR	0	0	0	1
C	3	2	7	3

FIGURE N° 14 b

*Inventaires des effectifs clonaux correspondants.*

Génération G1

	03	15	04	T
R	15	15	8	16
NR	3	0	10	0
C	0	3	0	2



## 5. introduction in vitro

Les manipulations sont effectuées sous hotte stérile à flux laminaire. Les différents lots de matériel végétal destinés à être introduits «in vitro» sont immergés ensemble 5 minutes dans de l'éthanol à 95°, puis 5 minutes dans une solution de chlorure mercurique à 2,5‰ avant d'être rincés dans trois bains consécutifs d'eau distillée stérilisée. Les explants sont alors excisés, puis introduits sur les milieux respectifs à raison de 18 unités par clone, à savoir : 03E, 04B, 15B et 45115 (T); des essais préliminaires ont été effectués avec 08R.

### 51 - LES BOURGEONS

Nous entendons par «bourgeon» l'extrémité apicale de l'axe végétatif limitée au méristème terminal renfermé dans les dernières feuilles formées. Les explants, prélevés sur les générations G0, G1 et G2 des clones 03, 04, 15 et 45115 greffés sont introduits sur le milieu M1 cité en annexe III.

Les observations au bout d'un puis de deux mois confirment les différences interclonales précédentes, en dépit des générations successives de greffes en cascade.

D'autre part, comme le constate Bekkaoui (1983) sur *Sequoia sempervirens*, les explants s'adaptent d'autant mieux à un milieu non optimal qu'ils sont issus de matériel juvénile.

### 52 - LES MICROBOUTURES

Les microboutures sont des parties terminales de 1 cm de long d'axes caulinaires végétatifs. La génération 00 a été prélevée en avril 1984 directement sur les ortets «in situ»; les générations G0 et G1 ont été introduites «in vitro» un mois plus tard, en mai, sur milieu M2 dont la composition est détaillée en annexe III. Les notations sont réalisées après deux mois de culture et sont résumées sur les figures 14.

On constate l'effet bénéfique du greffage de mobilisation G0 sur le comportement des microboutures in vitro. Conformément aux observations précédentes, T et 04 ont une croissance supérieure aux clones 03 et 15 que la génération G1 n'a pas stimulés.

A propos du critère «réactivité» - microboutures vivantes et caulogenèse, il faut souligner que le clone 04, génération G1, a été handicapé de façon significative ( $\chi^2 = 19,72$ ;  $\alpha < 0,001$ ) par une sensibilité inaccoutumée à l'éthanol lors de la désinfection.

## Commentaires

L'introduction des clones étudiés *in vitro* n'avait pas d'autre prétention que de confirmer les différences de comportement morphogène mis en évidence par les techniques de bouturage et de greffage, ce qui a été fait. Ces tests nous ont permis de constater par ailleurs que les conditions de culture *in vitro* du *Sequoia sempervirens* préconisées par Boulay (1977) et Bekkaoui (1983) ne sont pas adaptées au sequoia géant, hormis l'introduction directe des microboutures sur le milieu d'allongement M2 où le matériel juvénile peut occasionnellement s'enraciner.



Microgreffage *in vitro* de sujet centenaire.

Différences morphologiques entre microboutures prélevées sur un clone centenaire (à droite) et un clone juvénile (à gauche), en première génération *in vitro*.

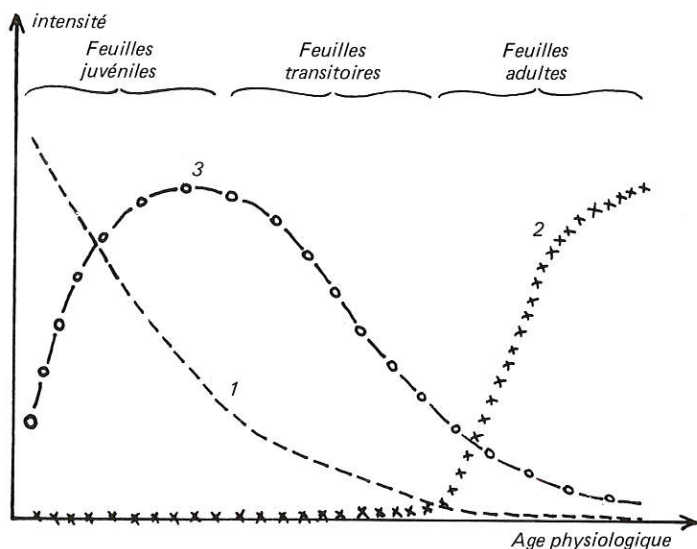
## 6. conclusions

La notion de clone implique une similitude morphologique entre des individus génétiquement identiques. Or, chez les arbres, la reproduction végétative, ou clonage, par les techniques de bouturage et greffage usuelles décrites, se déprécie en fonction du développement architectural croissant et, par suite, de l'âge de la tête de clone. Les potentialités morphogènes, variables selon les sujets, paraissent conditionnées par un certain état physiologique responsable d'une parcellisation (Nozeran, 1978) des structures morphologiques complexes étudiées. Borchert (1976) introduit la notion d'âge physiologique, qu'il différencie de l'âge chronologique, pour caractériser cette zonation des capacités à la régénération végétative, apparemment influencée par l'appareil racinaire, et à laquelle nous adhérons (fig. 15). Nous confirmons en cela, dans le cas du *Sequoiadendron giganteum*, des résultats déjà établis pour de nombreuses espèces ligneuses.

FIGURE N° 15

**Incidences de l'âge physiologique sur :**

1 : l'aptitude à la rhizogenèse; 2 : l'aptitude à la floraison; 3 : la vigueur de croissance végétative, en relation avec la morphologie foliaire. (d'après Borchert, 1976)



Dans l'état actuel des choses, et pour progresser sur le thème de l'aptitude au clonage des sujets sélectionnés, quel que soit leur âge, les observations morphogénétiques deviennent insuffisantes. L'état physiologique de compétence à la multiplication végétative, auquel nous faisons allusion une fois de plus, mérite une étude plus approfondie dans des domaines complémentaires tels que l'histologie, la cytologie et la biochimie. L'évolution des méthodes d'investigation biologiques, en relation avec les observa-



tions réalisées *in vitro*, sur des organes de plus en plus réduits (méristèmes), devraient permettre de définir la signification du terme rajeunissement, encore sujet à caution. Ce serait également un moyen de découvrir des critères ou marqueurs fiables actuellement indispensables pour quantifier le niveau de réactivation d'un clone et pouvoir le comparer légitimement à un matériel d'âge différent. Des études sur ces différents thèmes, culture *in vitro* notamment, sont actuellement en cours au laboratoire de phytomorphogénèse de l'Université de Clermont II.

## BIBLIOGRAPHIE

- BEKKAOUI F. (1983)  
« Microbouturage *in vitro* du *Sequoia sempervirens* (Endl.); étude de la rhizogénèse considérée comme critère de juvénilité chez deux clones d'âge différent »  
*D.E.A., Paris VI, 45 p.*
- BLETHON J. (1984)  
« Étude de la greffe des résineux »  
*Forêt Privée, n° 159, 95-105*
- BORCHERT R. (1976)  
« The concept of juvenility in woody plants »  
*Acta Horticulturae, n° 56, 21-36*
- BOULAY M. (1978)  
« Multiplication rapide du *Sequoia sempervirens* en culture *in vitro* »  
*Annales Afocel 1977, 38-67*
- BOULAY M. (1980)  
« La micropropagation des arbres forestiers »  
*C.R. Acad. Agri. Paris, 697-708*
- CHAJLAKHYAN M. KH, PODOLNYJ V.Z., BAVRINA T.V. (1974)  
« Particularités physiologiques des plantes juvéniles et régulation du caractère juvénile »  
*Uspekhi Sovremennoj biologii, n° 77, 106-116*
- DE LA GOUBLAYE DE NANTOIS T. (1980)  
« Rajeunissement chez le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) en vue de la propagation végétative. Études sur la plagiotropie des parties aériennes et racinaires »  
*DEA Université de Paris VI, 44 p.*
- DESTREMAU D.X., GUINAUDEAU F. (1980)  
« Quelques espèces méconnues... : le séquoia géant »  
*Afocel-Armef, Informations-Forêt, n° 149 (2), 93-107*
- DOORENBOS J. (1953)  
« Rejuvenation of *Hedera helix* in graft combinations »  
*Preb. 115, Wageningen, 28 nov. 1953*



- DOORENBOS J. (1965)  
« Juvenile and adult phases in woody plants »  
*Encycl. Plant. Physiol.* 1222-1235
- FINS L. (1980)  
« Propagation of giant Sequoia by rooting cuttings »  
*The international plant propagator's society*, n° 30, 127-132
- FRANCKET A. (1969)  
« Vers une production en masse de Cyprés de forme contrôlée »  
*Deuxième consultation mondiale dans l'amélioration des arbres. Washington*,  
7-16 août 1969, FO-FTB 69 11/18, 2-10
- FRANCKET A. (1982)  
« A propos d'une récolte de graines de séquoia géant et de calocède »  
*Annales Afocel* 1981, 328-380
- FRANCKET A. (1982)  
« Rajeunissement et micropropagation des ligneux »  
*Coll. Int. Culture in vitro essences forestières, IUFRO, Fontainebleau, France*  
31 août-9 sept. 1981, 55-64
- HACKETT W.P. (1980)  
« Control phase in woody plants in control of shoot growth in trees »  
*IUFRO Fredericton, New Brunswick, Canada*, 257-272
- HARE C. (1977)  
« How to root tree cuttings. Girdling promotes rooting of Slash pine cuttings.  
Effect of shoot girdling and season on rooting of Slash pine cuttings »  
*Forest Service. U.S. Department of Agriculture*, 1977
- HARTMANN H.T., KESTER D.E. (1975)  
« Plant propagation. Principles and practices Prentice Hall, inc. »  
*Englewood cliffs, New-Jersey*
- LACHAUD S. (1975)  
« Incompatibilité des greffes et vieillissement chez les végétaux. L'incompati-  
bilité des greffes et ses rapports avec le vieillissement »  
*Ann. Biol.* XIV, 98-128
- LIBBY W.J., WOLFORD J.L. (1976)  
« Rooting giant Sequoia cuttings »  
*The Plant Propagator*, n° 22 (2), 11-13
- MONTEUUIS O. (1984)  
« Étude de la multiplication végétative de Sequoiadendron giganteum (Lindl.)  
Buchholz en vue du clonage »  
*D.E.A. Clermont II*, 30 p.
- NOZERAN R. (1978)  
« Polymorphisme des individus issus de la multiplication végétative des végé-  
taux supérieurs avec conservation du potentiel génétique »  
*Physiol. Vég.* n° 16 (2), 177-194
- PLATT G.C. (1980)  
« Production of Sequoiadendron giganteum by cuttings »  
*The international plant propagator's society*, n° 30, 177-178
- WAREING P.F. (1959)  
« Problems of juvenility and flowering in trees »  
*Journal of the Linnean Society of London*, n° 56, 282-289

## RÉSUMÉ

Les possibilités offertes par la multiplication végétative de *Sequoiadendron giganteum* sont analysées simultanément sur des sujets juvéniles, trentenaires et centenaires.

Le bouturage met en évidence des différences liées à l'âge des individus, notamment en ce qui concerne la reproduction végétative au sens strict du terme. L'enracinement des ramets, susceptible de variations saisonnières, serait surtout conditionné par un état physiologique présumé, caractéristique de l'ortet et influencé par la proximité des racines, en relation avec la morphologie foliaire.

Le greffage confirme l'état bénéfique de l'appareil racinaire sur la réacquisition de certaines caractéristiques morphogénétiques des formes juvéniles. Dans cette perspective, les homogreffes sont préférables au choix de *Sequoia sempervirens* comme porte-greffe. D'autre part, la dimension du greffon aurait une influence certaine et déterminante quant au choix de la technique de greffage. Les différences interclonales persistent, quelle que soit la génération des greffes en cascade G0, G1, G2, G3 considérée. La variabilité intraclonale s'exprime par une hétérogénéité des réponses au sein d'un même lot de greffes, y compris pour le matériel juvénile. Cet inconvénient handicape passablement l'exploitation des observations.

Les tests de réactivité *in vitro*, à partir de bourgeons ou de microboutures, confirment les dissemblances entre les clones centenaires et le témon juvénile, et permettent d'envisager la réactivation *in vitro* du sequoia géant en vue du clonage.



## SUMMARY

Title of the article: «Vegetative multiplication of *Sequoiadendron giganteum* for mass propagation».

The potentialities of *Sequoiadendron giganteum* for vegetative multiplication are analysed simultaneously on young, 30 and 100 year old trees.

Propagation by rooted cuttings demonstrates the effect of tree age true to type vegetative reproduction. The rooting of cuttings depends on a certain physiological state influenced by the root proximity of the donor tree, the time of year and in relation with their foliar morphology.

Grafting, which permits the artificial approach of an adult ramet to an active root system, is confirmed as a means to recover some juvenile morphological characteristics. Grafting on *Sequoiadendron giganteum* rootstocks, as opposed to *Sequoia sempervirens*, favors this recovery. Furthermore one must choose the grafting technique which permits the miniaturization of the scions.

The interclonal differences persist throughout the repeated graftings — G0, G1, G2, G3. However, the large intraclonal variability within the same generation of grafts (even among the juvenile clone) limits a thorough analysis of the observations and the drawing of definite conclusions.

The reactivity tests by *in vitro* culture from buds or microcuttings confirm the dissimilarities between the 100 year old clones and the juvenile control clone, and indicate the possibility of *in vitro* reactivation of *Sequoiadendron giganteum* for clonal propagation.



## ZUSAMMENFASSUNG

Titel des Artikels: «Vegetative Fortpflanzung des Mammutbaumes (*Sequoiadendron giganteum*) zur Klonvermehrung».

In diesem Artikel werden die Möglichkeiten zur vegetativen Vermehrung des Mammutbaumes gleichzeitig bei jungen, 30- und 100-jährigen Bäumen erlassen.

Die Stecklingsvermehrung bringt die altersbedingten Unterschiede hervor, vor allen Dingen, was die bestimmten Merkmale im reinen Sinne der vegetativen Fortpflanzung anbelangt. Die Bewurzelung der Stecklinge ist von einem gewissen physiologischen Zustand abhängig, der von der Wurzelhöhe des Mutterbaumes und der Jahreszeit beeinflusst wird und mit ihrer foliären Morphologie im Zusammenhang steht.

Die Vermehrung durch Pfropfung, die die künstliche Verbindung an ein aktives Wurzelsystem ermöglicht, ist als Mittel zur Wiedergewinnung gewisser jugendlicher morphologischer Merkmale anerkannt. In diesem Sinn ist das Pfropfen auf *Sequoiadendron giganteum*-Unterlagen angebracht als auf *Sequoia sempervirens*-Unterlagen. Ausserdem erlaubt die Wahl der Veredelungstechnik die Miniaturisierung der Pfropfreiser.

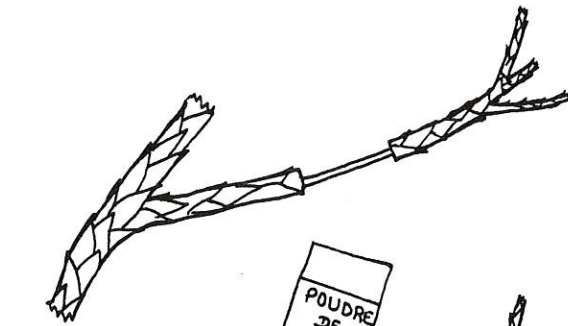
Die interklonalen Unterschiede bleiben ohne Rücksicht auf die wiederholten Pfropfungen - G0, G1, G2, G3 - erhalten. Die sogar bei dem jugendlichen Material bestehende intraklonale Variabilität innerhalb der gleichen Pfropfengeneration behindert wesentlich die Auswertungen der Beobachtungen, so dass endgültige Schlussfolgerungen nicht gezogen werden können.

Die Reaktivitätsversuche durch *in vitro*-Kultur von Knospen oder Mikrostecklingen bestätigen die Unterschiedlichkeiten zwischen den 100-jährigen Klonen und dem jugendlichen Kontroll-Klon; die Reaktivierung des Mammutbaumes zur Klonvermehrung durch *in vitro*-Kultur kann also in Betracht gezogen werden.



## Annexe I

### Marcottage aérien

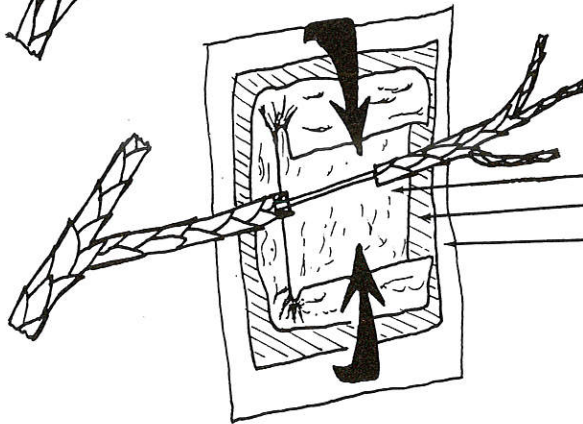


1. ANNÉLATION CORTICALE



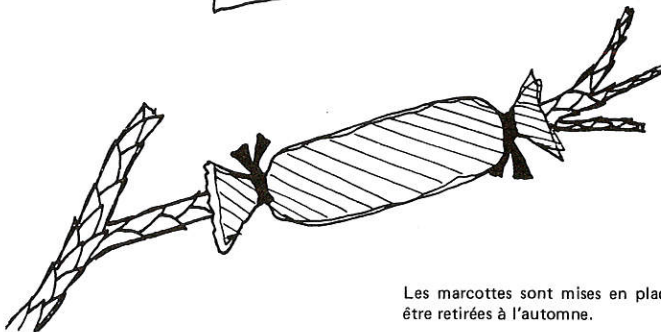
2. POUDRAGE AVEC SOLUTION  
PULVÉRULENTE DE HARE

1 % d'AIB  
1 % de PPZ (phényl 1, métyl 3,  
pyrazolone 5)  
98 % de talc



3. POSE DES ENVELOPPES

- a) manchon de mousse humide
- b) feuille d'aluminium
- c) feuille plastique



4. ASPECT EXTÉRIEUR D'UNE  
MARCOTTE AÉRIENNE

Les marcottes sont mises en place au début du printemps pour  
être retirées à l'automne.



## Annexe II

### Composition de la solution nutritive utilisée en rhizotron

NaCl . . . . .	5 mg/l
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O . . . . .	.135 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	36,5 mg/l
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	172,5 mg/l
KNO <sub>3</sub> . . . . .	.101 mg/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	5,50 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	82,5 mg/l
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O . . . . .	0,616 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O . . . . .	0,882 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> . . . . .	0,564 mg/l
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O . . . . .	0,196 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . . . . .	0,100 mg/l
Masquolate de fer . . . . .	.0,200 ml/l

## Annexe III

### Composition des milieux de culture in vitro en mg/l

	Milieu M1	Milieu M2
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> . . . . .	.825	825
KNO <sub>3</sub> . . . . .	.950	950
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O . . . . .	.220	220
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O . . . . .	.185	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	85	85
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O . . . . .	.13,9	13,9
Na <sub>2</sub> EDTA . . . . .	.18,6	18,6
MnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O . . . . .	.11,2	11,2
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O . . . . .	4,3	4,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> . . . . .	3,1	3,1
KI . . . . .	.0,41	0,41
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O . . . . .	.0,012	0,012
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O . . . . .	.0,012	0,012
AlCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O . . . . .	.0,025	0,025
Thiamine . . . . .	.0,05	0,05
Myo-inositol . . . . .	.100	50
Saccharose . . . . .	.30000	30000
ANA* . . . . .	.0,1	
BAP** . . . . .	.1	
Gélose (Bacto-Agar Difco) . . . . .	.7000	7000
Charbon actif (Merck 2186) . . . . .	.20.000	

\* acide α-naphtalène acétique

\*\* 6 Benzyl-amino-purine



Marcotte aérienne - clone 04 : remarquer la racine  
adventive sur bourrelet rhizomorphe consécutif à  
l'annélation corticale.

